



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Nutrición

**Efecto gastroprotector del zumo de hojas de Spinacia
oleracea “espinaca” frente a la hipersecreción inducida
por histamina en ratas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición

AUTOR

Frank Brandon SAMANIEGO TIAHUALLPA

ASESOR

Mg. Oscar Gustavo HUAMÁN GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Samaniego, F. Efecto gastroprotector del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Nutrición; 2019.

METADATA COMPLEMENTARIA

- Código ORCID del autor: (Dato opcional, debido a que no todos los egresados se dedican a la actividad investigativa)

No aplica

- Código ORCID del asesor(es) (Dato obligatorio):

0000 – 0002 – 6224 – 9165

- Grupo de Investigación (Asesor/Estudiante)

Salutaris Cibus e Plantae

- Nombre de Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

- Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación (incluirse localidades y/o coordenadas geográficas)

Centro de Investigación de bioquímica y Nutrición

- Año o rango de años que la investigación abarcó:

2017 - 2019



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina



Escuela Profesional de Nutrición

"Año de la Lucha contra la Corrupción y la Impunidad"

**ACTA N° 014 DE EXAMEN DE TITULACIÓN
MODALIDAD DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el artículo 45° de la Ley Universitaria 30220, el Jurado de Sustentación nombrado por el Comité de Gestión y la Dirección de la Escuela Profesional de Nutrición, conformado por las siguientes Docentes:

Presidente: Mg. Ivonne Isabel Bernui Leo

Miembros: Mg. Mauro Antonio Ruiz Tavares

Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas

Asesor: Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez

Se reunió en la ciudad de Lima, el día viernes 26 de abril del 2019, para proceder a evaluar la **Sustentación de Tesis para Optar el Título Profesional de Licenciado en Nutrición** del bachiller:

FRANK BRANDON SAMANIEGO TIAHUALLPA

Código de Matricula N° 11010436

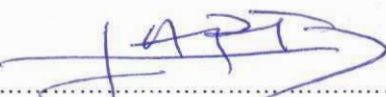
Tesis: "Efecto gastroprotector del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* "espinaca" frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas"
(Aprobado con RD N° 2690-D-FM-2016)

El mencionado bachiller aprueba el examen de titulación, mediante la modalidad de sustentación de tesis, obteniendo la calificación de:

Dieciocho (En letras)

Estando de acuerdo con la presente acta, el Jurado de Sustentación firma en señal de conformidad.


Mg. Ivonne Isabel Bernui Leo
Presidente


Mg. Mauro Antonio Ruiz Tavares
Miembro


Mg. Miguel Hernán Sandoval Vegas
Miembro


Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez
Asesor



DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado para “E”, una de las personas que me ha demostrado que con empeño y pasión; uno puede llegar lejos.

Una de las pocas personas que ha influenciado positivamente en todos los aspectos de la vida; de manera directa e indirecta. Así como, me ha enseñado a ver el mundo desde otro ángulo.

Estoy muy agradecido “E”.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y padre, por el apoyo incondicional en todo el proceso de mi formación personal y académica. Así como, a mi hermana; que, con sus ocurrencias y comentarios, brinda alegría a nuestro hogar.

Al asesor y amigo Mg. Óscar Huamán Gutiérrez por el apoyo incondicional y las recomendaciones que me han ayudado e influenciado en el desarrollo académico y personal.

A los Mg Mauro Ruíz, Miguel Sandoval e Ivonne Bernui que me apoyaron y aconsejaron en todo el trayecto de la ejecución de la tesis.

A la Unidad de Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM, por la oportunidad brindada al financiar la tesis presentada.

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barón” de la Facultad de Medicina de la UNMSM, por el espacio brindado para la ejecución de la investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros y amigos de trabajo, Lic. Marcos Escobar, Elvira Miranda, David Munemura, Vilma Poma por sus ánimos, alegría y consejos que transmitieron desde la primera vez.

A mis amigos que apoyaron y alentaron para que esta tesis pueda ejecutarse, Arturo Pérez, Juan Carlos Mollo, Astrid Bernal, Lizeth Palomino y a todo el grupo de “los experimentales”.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	8
2.1. HIPÓTESIS.....	8
2.2. OBJETIVOS	8
III. METODOLOGÍA	9
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	9
3.2. MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS.....	9
3.3. MATERIALES	9
3.4. VARIABLES.....	10
3.5. PLAN DE PROCEDIMIENTOS.....	12
3.5. ÉTICA DEL ESTUDIO	19
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	19
IV. RESULTADOS	20
4.1. PERFIL DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL TEJIDO GÁSTRICO	20
4.2. SECRECIÓN DE JUGO GÁSTRICO DEL TEJIDO GÁSTRICO.....	23
4.3. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA.....	25
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	37
6.1. CONCLUSIONES	37
6.2. RECOMENDACIONES.....	37
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Niveles de Glutación reducido, total y relación de glutación reducido-oxidado en el tejido gástrico	21
Tabla 2 Niveles de lipoperoxidación en el tejido gástrico	22
Tabla 3 Niveles de producción de moco en el tejido gástrico	23
Tabla 4 Volumen de jugo gástrico y nivel de pH	24
Tabla 5 Niveles de Acidez y actividad péptica total	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Microfotografía de tejido gástrico grupo I - control negativo	26
Figura 2 Microfotografía de tejido gástrico grupo II - control positivo	26
Figura 3 Microfotografía de tejido gástrico grupo III - administración con ranitidina	27
Figura 4 Microfotografía de tejido gástrico grupo IV – Zumo de espinaca 2 ml/kg	28
Figura 5 Microfotografía de tejido gástrico grupo V - zumo de espinaca 5 ml/kg	29
Figura 6 Microfotografía de tejido gástrico grupo VI - con espinaca 10 ml/kg	30

RESUMEN:

Objetivos: Determinar el efecto gastroprotector del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas. **Materiales y métodos:** analítico, experimental, longitudinal prospectivo; las 42 ratas Holtzman se distribuyeron en seis grupos (n=7). El zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” se obtuvo mediante un extractor casero el mismo día del tratamiento. El tratamiento para el grupo I y II fue de suero fisiológico 10 ml/kg, grupo III: ranitidina 50 mg/kg, grupos IV, V y VI: zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” de 2; 5 y 10 mL/kg de peso. Una hora después al tratamiento se realizó la ligadura pilórica; y a la hora, se administró vía subcutánea, con histamina 50 mg/kg de peso a los grupos II – VI, luego de 3 horas se anestesió con pentobarbital vía intraperitoneal, para la extracción del estómago y su contenido. Se determinó Glutación reducido, Glutación total, Lipoperoxidación, moco gástrico, pH, actividad péptica, acidez total, volumen gástrico y los cambios histológicos. **Resultados:** En los grupos V y VI administrados con zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” se evidenció un incremento de glutación reducido en un 52,6 y un 47,4%, la lipoperoxidación disminuyó en un 39,5 y 36,9%, la producción de moco incrementó en un 81,1 y 47,9% respectivamente. Sólo en el grupo V disminuyó el volumen gástrico en 38,1%, la acidez total en un 38,1%, y la actividad péptica en un 30,9%; mientras que el pH se incrementó en un 29,7%. En todas las microfotografías se evidenció una inflamación leve con daño mucinoso, mientras que en el grupo IV y V, no se presenta dicho daño. **Conclusión:** La administración del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” ejerció un efector gastroprotector frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.

Palabras clave: espinaca, *Spinacia oleracea*, histamina, ligadura pilórica, gastroprotector.

SUMMARY:

Objectives: To determine the gastroprotective effect of *Spinacia oleacea* leaf juice "spinach" against hypersecretion induced by histamine in rats. **Materials and methods:** analytical, experimental, longitudinal prospective; the 42 Holtzman rats were divided into six groups (n = 7). *Spinacia oleracea* "spinach" leaf juice was obtained of a homemade extractor on the same day of treatment. The treatment for group I and II was physiological serum 10 ml / kg, group III: ranitidine 50 mg / kg, groups IV, V and VI: juice of *Spinacia oleracea* "spinach" leaves of 2; 5 and 10 mL / kg of weight. One hour after the treatment, pyloric ligation was performed; and at the time, subcutaneously, with histamine 50 mg / kg of weight was administered to groups II - VI, after 3 hours was anesthetized with pentobarbital intraperitoneally, for the extraction of the stomach and its contents. Reduced Glutathione, Total Glutathione, Lipoperoxidation, gastric mucus, pH, peptic activity, total acidity, gastric volume and histological changes were determined. **Results:** In groups V and VI administered with *Spinacia oleracea* spinach leaf juice, an increase of reduced glutathione was evidenced in 52.6 and 47.4%, lipoperoxidation decreased by 39.5 and 36.9 %, mucus production increased by 81.1 and 47.9% respectively. Only in group V did the gastric volume decrease by 38.1%, total acidity by 38.1%, and peptic activity by 30.9%; while the pH increased by 29.7%. In all microphotographs, mild inflammation with mucinous damage was evidenced, while in group IV and V, no such damage is present. **Conclusion:** *Spinacia oleracea* "spinach" leaf juice administration exerted a gastroprotective effector against histamine-induced hypersecretion in rats.

Key words: Spinach, *Spinacia oleracea*, histamine, pyloric ligation, gastroprotector

I. INTRODUCCIÓN

Según el Ministerio de Salud del Perú (MINSA, 2014) en la actualidad las enfermedades gastrointestinales han ido en aumento, entre las más frecuentes están la gastritis y duodenitis, así como las dispepsias y las úlceras gástricas (1). El tratamiento éstas enfermedades depende de la gravedad, algunas veces solo se requiere mejorar la dieta y el estilo de vida y en otros casos se requiere algún tipo de tratamiento farmacológico (2).

En el 2014, en el Perú se reportaron cerca de 940 mil casos de enfermedades esofágicas y gastrointestinales en los establecimientos de salud, observándose un mayor número de casos en atenciones de gastritis y duodenitis en todos los departamentos. Sólo Lima se reportó 193 358 casos en enfermedades esofágicas y gastrointestinales en total y de las cuales 143 380 son casos de gastritis y duodenitis (1).

La gastritis y las úlceras se presentan cuando hay un desbalance entre los agentes protectores y dañinos; con aumento de estos últimos, ocasiona un daño considerable a la pared gástrica (3), y si el daño es de manera crónica puede tener repercusiones nutricionales (4).

La gastritis y las úlceras pépticas en la mayoría de los casos está asociado a la infección por *Helicobacter pylori* y al consumo de medicamentos antiinflamatorio no esteroideos (AINE's). Los casos por infección por *Helicobacter pylori* en los países industrializados va aumentando de acuerdo al incremento de la edad; así que el 50 a 60% de la población de los 60 años se ha infectado de *Helicobacter pylori* en la infancia; mientras que en los países emergentes, la prevalencia es de un 80% antes de cumplir los 20 años (5).

Según Soto en el 2016 indicó que el costo - efectividad para la disminución de la infección por el *Helicobacter pylori*, como medida para la erradicación de úlcera

péptica y cáncer gástrico mediante fármacos, se estiman un ahorro de 415, 52 euros por paciente atendido en un periodo de 4 años (6).

El consumo de AINE's puede traer complicaciones como gastropatías en los pacientes que consumen estos medicamentos durante un año o más, desarrollando enfermedades dispepticas en un 30 a 50%. Los factores de riesgo que puede complicar las gastropatías por consumo de AINE's se asocian a antecedentes de úlceras pépticas, personas mayores de 60 años y medicación a dosis altas (7). Las complicaciones dadas por las úlceras pépticas como el sangrado y las perforaciones presentan una tasa de mortalidad el 5 al 12% (8).

Cuando la enfermedad evoluciona, se le debe de agregar los costos del tratamiento. Un estudio realizado en el hospital de México en el 2009, estimó el costo realizado de las medidas inadecuadas de la terapia antisecretora (cirugías, medicina interna, Unidad de Cuidados Intensivos, Urgencias) en 828 pacientes, llegando a costar 77 415,22 dólares entre junio y setiembre (9). El tratamiento de la enfermedad con medicamentos genera un costo aproximado de 59 127 dólares en los pacientes que se administran omeprazol, lansoprazol, pantoprazo; además se observa que a los pacientes no se les indican el tiempo estimado de consumo de estos fármacos (10).

Existen diversos factores que pueden dañar la pared gástrica, entre ellos los más recurrentes están las infecciones de microorganismo (*Helicobacter pylori*), consumo de AINE's, tabaco, alcohol y el estrés psicosocial, si no es tratado adecuadamente, puede conllevar hasta una ulceración péptica; alterando el DNA y hasta llegar a inicios al desarrollo de cáncer (11) (12).

El estómago está conformado por cinco capas o tunicas: la mucosa epitelial, la muscularis mucosae, la submucosa, muscular (muscular circular y la longitudinal); y la capa más externa, que es la serosa (13). . Las unidades funcionales del estómago son las glándulas gástricas que se encuentran en la mucosa epitelial (14). Las glándulas del tejido gástrico pueden ser de dos tipos: glándulas oxínticas y glándulas pilóricas (15).

Las glándulas oxínticas están conformadas por las células parietales, células mucosas del cuello y las células pépticas. Las células parietales o también llamadas oxínticas, secretan ácido clorhídrico mediante la estimulación de señales endocrinas y nerviosas. Las células parietales operan con otro tipo de células llamadas células enterocromafines; los cuales se encargan de la liberación de histamina, y que puede ser estimulada a su vez por la hormona gastrina secretadas por las células G (14).

El estómago presenta diferentes regiones y pueden cumplir funciones específicas; el fundus ubicado en la parte superior y próximo al esfínter del cardias, el cuerpo del estómago se extiende desde el cardias y el fundus hasta el antro pilórico (aproximadamente hasta el ángulo de incisura), en esta región es donde se encuentran las células parietales, las cuales secretan de ácido clorhídrico. El antro pilórico del estómago comienza a partir del ángulo de incisura y al término del cuerpo del estómago y termina con la unión gastroduodenal (esfínter pilórico). El estómago cumple diversas funciones tanto motoras como el almacenamiento, mezcla, propulsión de los alimentos, así como también funciones secretoras; como la secreción del ácido clorhídrico o la producción del moco para su protección (16–18).

Ante un estímulo del nervio Vago que envía señales mediante la colescitoquinina (CCK) (que actúa como neurotransmisor u hormona) hacia las células G para que libere de gastrina. El CCK se une al receptor colescitoquinina 2 (CCK-2) de la célula parietal y en las células similares a las enterocromafines. En las células parietales estimula a la secreción ácida, mientras que en las células similares a las enterocromafines estimula la liberación de Histamina. La Histamina es sintetizada a partir de la histidina mediante la enzima Histidina descarboxilasa, mediante un estímulo paracrino estimula a la aceleración de la producción de acidez de las células parietales cuando se une a su receptor H_2 (19).

La producción del ácido clorhídrico se da únicamente en las células parietales a un pH promedio de 0,8, esta formación de ácido se da por una hidratación del CO_2 para formar un protón H^+ y bicarbonato, esta reacción es catalizada por la anhidrasa carbonica. El bicarbonato formado, es intercambiado por Cl^- en la membrana basolateral al líquido extracelular, y este cloro es luego secretado por

los canales de Cloro al canículo. En cuanto al protón H^+ , es bombeado al exterior por la bomba H^+/K^+ -ATPasa, el Potasio, el Potasio, por medio de bomba H^+/K^+ -ATPasa es retirado al líquido extracelular (15) (18).

Al mismo tiempo que se produce el ácido clorhídrico, también se forma el moco alcalino que cumple una función protectora frente al ácido. Las glándulas pilóricas; a diferencia de las glándulas oxínticas, presentan escasas células parietales y pocas células pépticas, en cambio posee células parecidas a células mucosas del cuello. La mucosa de la pared estomacal está formada por agua, lípidos, mucinas y bicarbonato, teniendo la capa un grosor aproximado de 1mm y manteniendo el pH neutro. Las mucinas presentan dos tipos MUC5AC y MUC6 que son secretadas por la mucosa superficial y del cuello respectivamente; las cuales, se caracterizan por la presencia de los puentes disulfuros dándole una consistencia viscosa (20).

El daño realizado en el tejido gástrico provoca un desbalance entre los factores protectores y agresivos incrementando el estrés oxidativo, y como medida de protección el tejido usa sus mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando el daño se hace crónico, los antioxidantes comienzan a agotarse, provocando un proceso inflamatorio en sus mecanismo de defensa epitelial; así como también puede haber alguna otra alteración de los mecanismo de defensa pre epiteliales o de los sub epiteliales (21,22).

El consumo de AINE's puede producir lesiones gástricas mediante dos mecanismos; tópico y sistémico. La lesión tópica depende de las características fisicoquímicas del AINE's; por el pH del estómago, estos fármacos se encuentran de forma no ionizada y por su liposolubilidad puede penetrar la pared de la célula epitelial produciendo muerte celular. Por otro lado, la lesión sistémica se produce por una inhibición de la síntesis de prostaglandinas E_2 (23).

La gastritis por infección de *Helicobacter pylori*, genera inicialmente una disminución en la producción del ácido, debido a las citoquinas, luego esta secreción ácida gástrica, estará determinada por la severidad y la afección de la gastritis, por lo que sí está ubicada en el antro, la lesión hipersecreción es mediada por la interleuquina 8 (IL-8) que incrementará la gastrina y en la disminución de la somatostatina antral. Por otro lado, si la gastritis afecta al

cuerpo del estómago, genera una hipoacidez y posteriormente una anacidez (24).

Se han propuesto diversos modelos de injuria *in vitro* – *in vivo*, que puedan asemejar el daño por diversos factores. Entre ellos, el modelo de injuria propuesto por Visser, que puede producir un proceso inflamatorio e inclusive uno ulceroso, esto debido a una secreción continua del HCl por una estimulación de sustancias; como es la histamina, gastrina, en conjunto a la acumulación de la secreción gástrica por el procedimiento quirúrgico de ligadura pilórica (25,26).

Diversos estudios han evaluado la capacidad antisecretora de diversos productos, Sandoval en el 2008, menciona que el Latex de *Croton palanostigma* “sangre de grado” neutralizado, disminuyó el volumen del jugo gástrico, así como la actividad péptica y sin variar el pH, mientras que el *Croton palanostigma* “sangre de grado” fue mayor la actividad péptica $5,34 \pm 1,04$ a dosis única de 0,8 mL/mg frente a la inducción con Histamina (27).

Así mismo, otro estudio determinó el efecto del extracto liofilizado del fruto de *Capsicum annum* L “pucunucho, ají mono” en modelos de inducción por indometacina y de ligadura pilórica. Los resultados muestran que a dosis de 100 mg/kg, se presenta una inhibición a un 66,7% en el modelo de indometacina; mientras que en el modelo de ligadura pilórica el porcentaje de inhibición fue de 81,63% (28).

Mientras que, en estudios previos con espinaca, mencionan la actividad antiulcerosa del extracto acuoso, frente a métodos de inducción por etanol, aspirina y ligadura pilórica teniendo un mayor efecto a dosis de 1000 mg/kg, teniendo una protección de un 62% en el caso de la ligadura pilórica, 74,77% frente a la aspirina y 65,27% frente al etanol. La protección es atribuida a la presencia de flavonoides, como la quercetina, miricitina y kamperferol y otros compuestos fenólicos presentes en la espinaca (29).

Mientras que en otro estudio realizado en el 2016, se comparó el efecto antiácido del jugo de espinaca y el extracto metanólico de la espinaca en un modelo artificial de estómago, dando como resultado que el extracto metanólico a 200 mg/kg y el jugo de espinaca incrementan el pH así como su capacidad para la neutralización (30).

El estudio realizado por Rahati sobre el efecto del extracto acuoso de la espinaca en la cicatrización de heridas en un modelo de diabetes experimental. Se observó una mejora significativa en el examen macroscópico, en la formación del tejido epitelial y de la formación de nuevo vasos sanguíneos a nivel microscópico y además en el incremento del factor de crecimiento vascular endotelial de grupo que recibió el extracto acuoso. Se le atribuye a las vitaminas A y C presentes en la espinaca y que ayudan en la regeneración de la piel (31).

Se ha observado el efecto protector de la espinaca en hígado de ratones frente a la exposición de rayos gamma. Viendo que hay una mayor protección en el día 15 de un 42,84% sobre los niveles de lipoperoxidación, así como un 53,81% de protección en cuanto al indicador de glutatión a dosis de 1100 mg/kg de peso. Esta protección puede deberse a la presencia de carotenos (β caroteno, zeaxantina, luteína) en la espinaca, así como los flavonoides, ácido ascórbico y ácido p- coumarico (32).

La *Spinacia oleracea*; más conocida como espinaca en nuestro medio, es originaria del sureste de Asia e introducida a Europa en los años 1000 aproximadamente. Está distribuida principalmente en Europa, Asia y parte de Latinoamérica (33). La espinaca pertenece a la familia Amaranthaceae, sub-familia Chenopodioidae (34).

La espinaca es una planta anual; su raíz es poco ramificada y de desarrollo superficial mientras que el tallo puede alcanzar una altura de 30 cm. Las hojas son caulíferas, alternas y pecioladas, de color verde oscuro (35). La producción peruana de espinaca de forma anual es de 30,499 toneladas métricas del 2013, y siendo el departamento Lima el que mayor contribuye en la producción con 16,432 toneladas métricas con las provincias de Huaral y Canta y el siguiente departamento es Junín con 10,280 toneladas (36).

Dentro de la composición nutricional en 100 g de espinaca deshidratada contiene en total 12,98% de lípidos; y de estos, el 68% son poliinsaturados, el ácido linoleico es el que tiene mayor presencia con 22,9%. La composición de proteica resulta que contiene 31,72%, el aminoácido que más destaca es el ácido glutámico (37).

En un estudio se determinó las concentraciones de miricentina, kamperferol y del total de flavonoides en espinaca fueron $1660,9 \pm 30,2$ mg/kg, $59,6 \pm 1,8$ mg/kg y $1720,5 \pm 37,6$ mg/kg respectivamente. Sin embargo la determinación de quercetina fue menor a 0,04mg/L (38). En otro estudio, se determinó la concentración de fenoles fue de un 45,24%, de flavonoides 27,34%, de saponinas 5,23% y de alcaloides 4,82% en espinaca, compuestos que funcionan como antioxidantes que funcionan como medicina terapéutica frente a las enfermedades (39).

El estilo de vida contemporáneo, la persona puede presentar cambios y a veces ausencia en los tiempos de alimentación, una dieta no balanceada, infecciones por microorganismos; entre ellas, el *Helicobacter pylori*., el consumo de sustancias que pueden dañar la pared gástrica, y otros factores; como el estrés, pueden alterar el desbalance entre los agentes protectores y dañinos en la mucosa gástrica. Cuando el daño es severo, la mucosa gástrica no funciona adecuadamente y se opta por la medicación, produciendo efectos adversos y pudiendo inclusive perjudicar el estado nutricional de la persona.

La búsqueda de nuevas alternativas naturales; como son los alimentos funcionales pueden mejorar el estado de la persona, ayudando a prevenir o tratar la enfermedad, de tal manera que no recurran tanto a los fármacos y que favorezca el balance entre los agentes protectores y dañinos.

Una de las ventajas de la espinaca es que pueden cumplir diversas funciones en el organismo; pueden ayudar a protección y recuperación de diversos órganos, cumpliendo una función antioxidante u otra función (40). Otra de las ventajas que presenta es su bajo costo, ahorrando inclusive aún más que en la adquisición de medicamentos o suplementos y buena disponibilidad y tal vez en un futuro mejorando la producción de estos alimentos.

El presente trabajo tiene el fin de contribuir en la generación de conocimientos sobre la prevención de ciertas enfermedades gástricas, mediante la investigación de alimentos; como la espinaca, para que puedan servir como coadyuvante en la prevención de diversas enfermedades gastrointestinales.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

- El zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” tiene efecto gastroprotector frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar el efecto gastroprotector del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.

Objetivos Específicos

- Determinar el efecto del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” sobre los marcadores bioquímicos en el tejido gástrico frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.
- Determinar el efecto del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” sobre la secreción del jugo gástrico frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.
- Determinar el efecto del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” sobre los cambios histológicos frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.

III. METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

De acuerdo a Argimon, la investigación se clasifica como: analítico, experimental, longitudinal prospectivo (41).

3.2. MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

Se emplearon 42 ratas *Rattus norvegicus* albinas Holtzman machos de 2 meses de edad aproximado, cuyos pesos promedio estuvo comprendido entre 220 ± 10 gramos y fueron adquiridas en el Centro de Producción de la UNALM.

3.3. MATERIALES

Material biológico

- *Rattus norvegicus* ratas machos variedad Holtzman.
- Hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca”

Equipos e instrumentos

- Homogenizador de tejido modelo Tissue Tearor modelo 985370, de 5 000 a 32 000 RPM y con intensidad de corriente de 1,2 Amperios.
- Centrífuga automática refrigerada modelo Sorvall RC 2-B.
- Micropipetas: Hirschmann Laborgerate, Accumex
- Baño María
- Estufa

Reactivos

- Ácido formilfórmico (Ácido Glioxílico monohidratado) G-4627.
- Ácido 2 –tiobarbitúrico (TBA).
- 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoico ácido) 3-carboxyl-4-nitrophenil disulfide Reactivo de Ellman (DTNB).

- Trizma base SIGMA
- Reactivo de Folin.
- Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Ácido ascórbico D-6100 Darmstadt pro-analysis
- Éter dietílico.
- Hidróxido de Sodio (NAOH).

3.4. VARIABLES

Variable independiente

Zumo de las hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca”: Es el líquido de la parte comestible de la espinaca que se obtiene por exprimido o majándolo (42).

Variable dependiente

Efecto gastroprotector: Inhibición de la injuria inducida por histamina en el tejido gástrico (3).

Definición operacional de variables

VARIABLE	TIPO	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	PUNTOS DE CORTE	ESCALA DE MEDICIÓN	
Zumo de hojas de <i>Spinacia oleracea</i> "espinaca"	Variable independiente	Es el líquido de la parte comestible que se obtiene por exprimido o majándola.	-	Extracción del zumo de las hojas de espinaca mediante un extractor casero	Administración del zumo de hojas de <i>Spinacia oleracea</i> "espinaca"	2 mL/ kg de peso del animal	Razón	
						5 mL/ kg de peso del animal		
						10 mL/ kg de peso del animal		
Efecto gastroprotector	Variable dependiente	Inhibición de la injuria inducida por histamina en el tejido gástrico.	Marcadores Bioquímicos	Cambios en la concentración de los indicadores bioquímicos	Niveles de Glutación reducido (mg/ g de tejido)	Valores comparados con el grupo II	Razón	
					Niveles de Glutación total (mg/ g de tejido)			
					Lipoperoxidación (nmol/g de tejido)			
					Moco gástrico (mg de Ab/ g de tejido)			
			Secreción del jugo gástrico	Cambios en los indicadores de secreción del jugo gástrico	pH			
					Actividad péptica (µg tirosina / mL/ 4h)			
					Acidez Total (mEq-H ⁺ /L/4h)			
					Volumen de jugo gástrico (mL)			
			Evaluación histológica	Cambios histológicos del tejido gástrico	Tipo y localización de inflamación, presencia de células inflamatorias y de daño mucinoso		Nominal	

3.5. PLAN DE PROCEDIMIENTOS

Obtención de la muestra

Las hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” se obtuvieron del “Mercado de Productores” del distrito de Santa Anita y se seleccionaron las hojas verdes oscuras con un tamaño adecuado y de procedencia de Tarma - Junín.

Obtención del zumo

Se seleccionaron las hojas verdes oscuras, luego se procedió a lavar y desinfectar en un litro de agua con cinco gotas de lejía para luego secarlas rápidamente con papel toalla. El zumo de hojas *Spinacia oleracea* “espinaca” se obtuvo cada día que duró el tratamiento, mediante un extractor casero.

Acondicionamiento de los animales

Las ratas tuvieron un periodo de adaptación de tres días, recibieron alimentación equilibrada; que fue adquirida en el Centro de Producción de la UNALM, y agua *ad libitum*; así como, la temperatura ambiental oscilaba de 20 a 22°C y con una iluminación de 12 horas.

Evaluación del efecto gastroprotector

Para su estudio, se siguió el protocolo de ligadura pilórica, modelo planteado por Vissher y colaboradores, 1954 y variado por Sandoval (27).

Concluido el proceso de aclimatación, las ratas se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos (n = 7); con previo ayuno de 18 horas. Tras el ayuno, se administró las siguientes sustancias vía peroral mediante una cánula metálica:

Grupo I: suero fisiológico de 10 mL / kg (control negativo)

Grupo II: suero fisiológico de 10 mL / kg (control positivo)

Grupo III: Ranitidina de 50 mg/kg (control estándar)

Grupo IV: zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” de 2 mL/kg

Grupo V: zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” de 5 mL/kg

Grupo VI: zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” de 10 mL/kg

Luego de una hora, se procedió al proceso quirúrgico de laparotomía abdominal para poder ligar el píloro, previa anestesia con vapores de éter dietílico. Cumpliendo con una hora después de la intervención quirúrgica, se le aplicó histamina 50 mg/kg de peso a los grupos II – VI, vía subcutánea, para inducir secreción gástrica.

Pasadas las cuatro horas de la intervención quirúrgica se le volvió a anestesiarse con pentobarbital sódico 26 mg/kg vía intraperitoneal, para poder realizar de nuevo la laparotomía y extraer el estómago. El contenido gástrico fue recolectado en frascos taparrosca y mantenido a una temperatura de 4°C hasta el análisis respectivo.

El interior del estómago fue expuesto, cortando la curvatura mayor y lavado en suero fisiológico; para después, aislar una parte glandular del estómago, del cual se tomó la mitad cercana al píloro para los análisis bioquímicos, mientras que la otra parte homóloga fue destinada para el análisis histopatológico.

El procedimiento y la manipulación del tejido se realizó en un cuarto aislado en el Instituto Centro de Investigaciones de Bioquímica y Nutrición y a una temperatura de 4°C con la finalidad de conservar el tejido.

Las muestras de tejido y jugo gástrico fueron sometidas a los siguientes análisis:

Determinación glutatión reducido y glutatión total.- Método propuesto por Sedlak y Lindsay, en 1968 (43), para determinar el GSH; se utilizó DTNB, los cuales reaccionan, presentando una coloración amarilla. La eliminación de los grupos sulfhidrilos existentes en la glicoproteína del mucus, fue mediante el ácido tricloroacético (TCA) y para prevenir la activación de metaloproteasas se utilizó EDTA, un quelante de los cationes divalentes (Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2}), los cuales activarían las enzimas.

Para la preparación del homogenizado:

Se analizó 200 mg de tejido glándular gástrico y se homogenizó con 2,5 mL de EDTA 0,02 mol/L helado y se mantuvo a temperatura de 4°C.

Determinación de GSH reducido: En un tubo de ensayo, se mezcló 1 mL del homogenizado, 400 μL de TCA 50% y de 800 μL de agua destilada; y se dejó reposar por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 15

minutos; y en otro tubo de ensayo, se mezcló 1 mL del sobrenadante con 2 mL de buffer TRIS 0,4mol/L con pH de 8,9 a una temperatura de 70°C por 10 minutos, luego se retiró y se dejó enfriar, a ello se le agregó 50 µL del DTNB al 0,01 mol/L y se mezcló. Antes de cumplir los 5 minutos, la absorbancia fue leída y registrada a 412 nm. Los resultados fueron expresados como mg de GSH/mL/g de tejido mediante la fórmula:

$$[GSH \text{ mg/g}] = \frac{Fc \times Vh \times VD \times VRX}{VHD \times VSN \times W}$$

VHD: Volumen del homogenizado para la precipitación 1mL

VD: Volumen de desproteinizado 2,2mL

Vsn: Volumen del sobrenadante 0,5 mL

VRx: Volumen de la reacción 2,550 mL

W: peso del tejido a homogenizar. Aproxmadamente 0,3 g

Vh: Volumen de homogenizado aproximadamente 2,5 mL

Y también fueron expresados en porcentaje de incremento:

$$\% \text{ de incremento de GSH} = (IGSt - IGSc) / IGSc \times 100\%$$

IGSt: Índice de grupos sulfhidrilos no proteico del tratamiento

IGSc: Índice de grupos sulfhidrilos no proteico del control.

Determinación del GSH total: En un tubo de ensayo, se mezcló 1 mL del homogenizado con 800 µL agua destilada y 400 µL del TCA al 50%; y durante 15 minutos, se centrifugó a 4000 RPM. Se extrajo 1 mL del sobrenadante y añadió 2 mL de buffer TRIS al 0,4 mol/L (14 mg vitamina C/ 7 mg ácido glioxílico/ 14 mL de Buffer con pH de 8,9) a temperatura 70°C por 10 minutos; a ello, se agregó 50 µL del DTNB 0,01 mol/L y se homogenizó.

La absorbancia se leyó a 412 nm antes de cumplir los 5 minutos y se registraron, los resultados fueron expresados como mg de GSH/mL/g de tejido, mediante la fórmula:

$$[GSH \text{ mg/g}] = \frac{Fc \times Vh \times VD \times VRX}{VHD \times VSN \times W}$$

VHD: Volumen del homogenizado para la precipitación 1 mL

VD: Volumen de desproteinizado 2,2 mL

Vsn: Volumen del sobrenadante 0,5 mL

VRx: Volumen de la reacción 2,550 mL

Vh: Volumen de homogenizado aproximadamente 2,5 mL

W: peso del tejido a homogenizar

Y también fueron expresados en porcentaje de incremento:

$$\% \text{ de incremento de GSH} = (IGSt - IGSc) / IGSc \times 100\%$$

IGSt: índice de grupos sulfhidrilos no proteico del tratamiento,

IGSc: índice de grupos sulfhidrilos no proteico del control.

Determinación de Lipoperoxidación.- Se utilizó el procedimiento de Buege J. Aust S. (1978) (44) y que fue modificado por Suárez en 1995. Dos moles de ácido tiobarbitúrico (TBA) reaccionan con un mol de malondialdehído (MDA); resultado de la lipoperoxidación de ácidos grasos presentes en la membranas celulares; principalmente, y cuando reacciona con el TBA, resulta en un complejo coloreado (color rosado) a una absorción de 535 nm.

Protocolo: Se preparó un homogenizado con tejido glandular en un volumen de 2,5 mL, luego de este homogenizado se colocó 600 µL y a esto se le añadió 1,2 mL de TCA 20%. Para después llevar a baño María de 100°C por 10 minutos. Se le agregó 1,8 mL de TBA 0,67% en HCl al 0,25 N y se llevó a baño María de 100°C durante 20 minutos; luego de enfriar, se centrifugó a 3500 RPM durante

10 minutos y se midió las absorbancias a 535 nm. Los resultados se expresaron como $\eta\text{mol/g}$ de tejido por la fórmula:

$$[TBARS \text{ nmol/mL}] = \frac{ABS(MP-BL) \times V_{Rx} \times 10}{\epsilon \times l \times V_s}$$

ABS (MP): absorbancia de muestra problema

ABS (BI): absorbancia de blanco

V_{Rx} : Volumen de reacción

l : longitud de la cubeta 1 cm.

ϵ : Coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Y también fueron expresados en porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ de inhibición} = (IGC - IGMP) / IGC \times 100\%$$

IGC: grupo control

IGMP: grupo muestra problema

Determinación de moco gástrico.- Según el método modificado por Corner (1974) (27), El Alcian blue en medio acuoso posee carga positiva, el cual va a interactuar con los grupos hidroxilos de los restos de azúcares de la glicoproteína del moco gástrico, para la remoción del moco de la parte muscular se utilizó MgCl_2 y el Mg^{+2} que desplaza al Alcian blue adherido a la glicoproteína.

Protocolo: Se colocó el segmento glandular en un frasco con taparrosca y se añadió 7 mL de solución de Alcian Blue al 0,2g%, se mezcló ligeramente y se dejó reposando durante una hora. Se eliminó el colorante y luego se lavó 2 veces con 7 mL de sacarosa 0,25 mol/L para después eliminar el excedente de sacarosa, se añadió 5 mL de MgCl_2 al 0,5 mol/L, se cerró el recipiente y se agitó vigorosamente.

En un tubo de ensayo se colocó 3 mL del contenido y añadió 1 mL de éter dietílico, en donde se agitó y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos,

se dejó el moco y se agregó 5 mL de solución ácido acético 0,1 mol/L en alcohol al 70°, se agitó constantemente por 10 segundos, luego se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos y se leyó el sobrenadante en espectrofotómetro a 598 nm. Estos resultados fueron expresados en mg alcian blue/ mL/ g de tejido.

$$[\text{Moco gástrico mg de Ab/mL/g}] = \frac{(\text{Fc} \times \text{V Ext} \times (\text{ABSMP} - \text{BL}))}{\text{Wc} \times \text{Vc}}$$

Fc: factor de calibración

V Ext: volumen de extracción.

ABS (MP-BL): absorbancia de la muestra del problema restado del blanco reactivo.

Wc: peso del moco gástrico

Vc: volumen de reacción (3 mL)

El incremento de moco además fue expresado en porcentaje comparado con el grupo I, mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Incremento de moco} = \frac{(\text{IMG I} - \text{IMG Tto})}{(\text{IMG I})}$$

IMG Tto: índice de moco gástrico del grupo de tratamiento.

IMG I: índice de moco gástrico del grupo I.

Determinación de la actividad péptica de la mucosa gástrica.- Se utilizó el método modificado de Anson (1938), la pepsina es una endopeptidasa que hidroliza enlaces peptídicos formados por leucina, tirosina o fenilalanina (27). La reacción de reconocimiento de los productos de la hidrólisis ocurre por lo menos en 2 pasos, primero se forma un complejo de Biuret, entre el Cu^{+2} y el enlace peptídico, esta acción favorecería la reducción a Cu^+ . El segundo paso, el Cu^+ reduce el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo cual da lugar a un cromógeno de color azul. También contribuyen a la oxidación del reactivo de Folin-Ciocalteu las cadenas laterales de algunos aminoácidos como la tirosina, fenilalanina, triptófano y en menor medida cisteína e histidina.

Protocolo: Se incubó 0,2 mL de jugo gástrico con 1 mL de albúmina (5 mg/mL en HCl 0,06 N) por 10 minutos, se detuvo la reacción con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10g%, luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se tomó 500 µL del sobrenadante en un tubo de ensayo y agregó 2,5 mL de Na₂CO₃ 0,55 mol / L y se homogenizó. Se añadió 250 µL de reactivo de Folin al homogenizado; se mezcló y dejó reposar durante 30 minutos alejado de la luz, las absorbancias fueron leídas con el espectrofotómetro a 660 nm.

Determinación de la acidez total. - Por medio de una titulación se cuantificó la [H⁺] presentes en la secreción gástrica, tanto los libres (H₃O⁺) y los captados por sustancias presentes en el contenido gástrico (proteínas, fosfatos, etc.)

Protocolo: Del sobrenadante del jugo gástrico, se extrajo 0,1 mL y se mezcló por rotación con 5 mL de agua destilada, luego se agregó 2 gotas de fenolftaleína y se procedió a titular con NaOH 0,01N con una pipeta de 1 mL (±0,01 mL). Estos resultados se expresaron en mEq-H⁺/mL/4 horas.

Determinación de pH del jugo gástrico.- Mediante un potenciómetro, se determinó el nivel de pH (27).

Protocolo: Se colocó en un tubo de ensayo 0,1 mL del sobrenadante de jugo gástrico, se agregó 9,9 mL de agua destilada, agitó vigorosamente y dejó reposar por 10 min.

Se midió el pH con el potenciómetro y se restaba 2 unidades a la lectura del equipo para registrar su valor.

Análisis histológico. – Los 42 tejidos gástricos fueron procesados mediante la técnica de tinción hematoxilina-eosina en el Instituto de Patología de la UNMSM (45). Para la lectura de las láminas, se escogieron aleatoriamente 4 muestras por grupo y fueron analizadas por un médico especialista en anatomía patológica, considerando los siguientes aspectos inflamatorios: el tipo de inflamación, células inflamatorias presentes, densidad inflamatoria, localización de la inflamación y daño mucinoso.

3.5. ÉTICA DEL ESTUDIO

Los animales de experimentación, fueron manejados de acuerdo a las normas éticas de experimentación animal y respetando 2 Rs (reducción y refinamiento) de las 3 R propuestas por Russel y Burch (46).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La tabulación de los datos se realizó en el programa Excel 2013 y para su análisis, se procedió a utilizar el programa estadístico informático SPSS V. 18. Se aplicó la prueba de Shapiro Wilk para los indicadores bioquímicos y de jugo gástrico. Para los indicadores con distribución simétrica se aplicó ANOVA y como prueba *post hoc* se aplicó la prueba de contraste. Mientras que los indicadores con distribución asimétrica se aplicó Kruskal-Wallis. Los datos fueron expresados en media y desviación estándar o medianas.

IV. RESULTADOS

Los indicadores de volumen de jugo gástrico, acidez total, actividad péptica total, glutatión reducido y total, presentaron una distribución simétrica de acuerdo con la prueba de Shapiro Wilk, por lo que se ejecutó la prueba ANOVA y luego la prueba *post hoc* de contraste. Mientras que, para los indicadores de pH, lipoperoxidación, relación de glutatión reducido-oxidado y moco se aplicó el análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

4.1. PERFIL DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL TEJIDO GÁSTRICO

4.1.1. Perfil del nivel de GSH

Se observa que la administración con histamina en el grupo II (control positivo) presentó niveles más bajos de GSH reducido y total comparados con el grupo I (Tabla 1), sólo presentando significativo sólo en el GSH ($p < 0,05$); además, se observó que la relación GSH/GSSG es menor en este grupo (0,8).

El grupo III; grupo que recibió Ranitidina previamente, presentó niveles más altos de GSH ($p < 0,05$) y GSG/GSSG comparados con el grupo II. Los niveles de glutatión total en el grupo III fueron mayores e inclusive superaron los niveles del grupo I.

Los grupos del IV, V y VI que fueron tratados previamente con espinaca a dosis de 2, 5 y 10 mL/kg de peso respectivamente, presentaron mayores niveles de GSH comparados con el grupo II (control positivo), presentando sólo diferencia estadística significativa en el grupo V ($p < 0,05$). En el indicador glutatión total, se observó un incremento en la concentración en los grupos; sin embargo, no fue significativo.

Tabla 1 Niveles de Glutación reducido, total y relación de glutatión reducido-oxidado en el tejido gástrico

Grupos	GSH reducido*		GSH total*		GSH/GSSG	
	mg/g	% de incremento	mg/g	% de incremento	% de incremento	
Grupo I	14,7 ± 3,9 ^(a)		19,0 ± 5,1		3,8 ^(a)	
Grupo II	7,8 ± 3,2		14,8 ± 3,2		0,8	
Grupo III	14,7 ± 2,9 ^(a)	88,5	23,6 ± 3,9	60,8	1,9	137,5
Grupo IV	8,9 ± 1,9	14,1	15,3 ± 3,2	3,4	1,3	62,5
Grupo V	11,9 ± 3,9 ^(a)	52,6	19,3 ± 6,7	30,4	1,5	87,5
Grupo VI	11,5 ± 2	47,4	19,9 ± 3,9	34,4	1,45	87,5

Grupo I (control negativo), Grupo II (control positivo), Grupo III (control estándar), Grupos IV – VI (zumo de espinaca 2, 5 y 10 ml/kg).

*Shapiro Will $p > 0,05$ MEDIA ± DE

(a) $p < 0,05$, comparado con el grupo II

4.1.2. Niveles de Lipoperoxidación

El grupo II (control positivo) presentó niveles más altos de lipoperoxidación comparado con el grupo I (control negativo) ($p < 0,05$). Mientras que el nivel de lipoperoxidación del grupo que recibió Ranitidina previamente (grupo III), presentó una inhibición del 59,6% comparados con el grupo II, mientras que la producción de moco gástrico en el grupo III presentó niveles más altos (Tabla 2).

De acuerdo con la tabla 2, los grupos con tratamiento con espinaca (grupo IV, V y VI) presentaron niveles más bajos de lipoperoxidación e inclusive menores al grupo I, presentando diferencia estadísticamente significativa con el grupo de V (5 mL/kg de peso) y grupo VI (10 mL/kg de peso) ($p < 0,05$).

Tabla 2 Niveles de lipoperoxidación en el tejido gástrico

Grupos	Lipoperoxidación	
	$\mu\text{M/g}$	% de inhibición
Grupo I	19,2 ^(a)	
Grupo II	26,0	
Grupo III	10,5	59,6
Grupo IV	17,8	31,5
Grupo V	15,8 ^(a)	39,5
Grupo VI	16,4 ^(a)	36,9

Grupo I (control negativo), Grupo II (control positivo), Grupo III (control estándar), Grupos IV – VI (zumo de espinaca 2, 5 y 10 ml/kg).

(a) $p < 0.05$, comparado con el Grupo II

4.1.3. Niveles de Moco Gástrico

El grupo II presentó niveles de producción de moco gástrico inferiores, comparados con el grupo I, con una diferencia significativa de un $p < 0,05$ (Tabla 3). Mientras que en el grupo III, la producción de moco gástrico incrementó en un 155,5% con respecto al grupo II (Tabla 2).

Con respecto a los niveles de producción de moco gástrico en los grupos con el tratamiento de espinaca (grupo IV, V y VI), hubo un incremento de 42,4, 81,1 y 47,9% respectivamente, comparados con los niveles del grupo II, presentando diferencia significativa a dosis de 5 mL/kg de peso (grupo V) con un $p < 0,05$ (tabla 3).

Tabla 3 Niveles de producción de moco en el tejido gástrico

Grupos	Moco Gástrico	
	µg/g/mL	% de incremento
Grupo I	253,1 ^(a)	
Grupo II	117,2	
Grupo III	299,5	155,5
Grupo IV	166,9	42,4
Grupo V	212,2 ^(a)	81,1
Grupo VI	173,4	47,9

Grupo I (control negativo), Grupo II (control positivo), Grupo III (control estándar), Grupos IV – VI (zumo de espinaca 2, 5 y 10 ml/kg).

(a) $p < 0.05$, comparado con el Grupo II

4.2. SECRECIÓN DE JUGO GÁSTRICO DEL TEJIDO GÁSTRICO

4.2.1. Volumen y pH del jugo gástrico

Se observa que la administración de histamina en el grupo II presentó una mayor secreción del volumen de jugo gástrico en 4 horas y un menor nivel de pH, comparado con el grupo I.

La secreción de jugo gástrico en el grupo administrado con ranitidina (grupo III) presentó menor nivel comparado con el grupo II, expresando una inhibición del 43,5% con respecto al grupo II. Mientras que los niveles de pH fueron superiores en un 69,5% con respecto al grupo II (Tabla 4).

Los grupos V y VI, que fueron tratados con el zumo de *Spinacea oleracea* “espinaca” con dosis de 5 y 10 mL/kg, presentaron una inhibición en la secreción del volumen del 38,1 y 22,3% respectivamente, siendo el grupo de dosis de 5 mL/kg de peso el que presentó diferencia significativa con respecto al grupo II ($p < 0,05$).

En el indicador de pH, los grupos con tratamiento de zumo de *Spinacea oleracea* “espinaca” presentó mayores niveles de pH con respecto al grupo II, y teniendo

un incremento del 5,1, 29,7 y 11% respectivamente. Sólo se presentó diferencia estadística significativa en el grupo V ($p < 0,05$).

Tabla 4 Volumen de jugo gástrico y nivel de pH

Grupos	Volumen jugo gástrico*		pH	
	mL/4 h	% de inhibición	Nivel	% incremento
Grupo I	8,1 ± 1,7	--	1,36	--
Grupo II	9,8 ± 2,0	--	1,18	--
Grupo III	5,5 ± 2,0	43,5	2,0	69,5
Grupo IV	10,1 ± 2,3	-3,1	1,24	5,1
Grupo V	6,0 ± 1,7 ^(a)	38,1	1,53 ^(a)	29,7
Grupo VI	7,6 ± 1,7	22,3	1,31	11

Grupo I (control negativo), Grupo II (control positivo), Grupo III (control estándar), Grupos IV – VI (zumo de espinaca 2, 5 y 10 ml/kg).

*Shapiro Will $p > 0,05$ MEDIA ± DE

(a) $P < 0,05$ comparado con el grupo II

4.2.2. Niveles de protones totales y actividad péptica

La administración de histamina en el grupo II produjo un mayor nivel de secreción de protones totales y la actividad péptica; sin embargo, no fue significativo con respecto al grupo I.

La administración previa de ranitidina (grupo III) presentó bajos niveles de protones totales comparados con el grupo II, presentando una inhibición del 74,1%. La actividad péptica total, presentó bajos niveles al compararse con el grupo II presentando una inhibición del 22,6% (Tabla 4).

Los grupos que fueron tratados con el zumo de *Spinacea oleracea* “espinaca” a dosis de 5 y 10 mL/kg de peso (grupo V y VI) presentaron un menor nivel de acidez al ser comparados con el grupo II y presentando una inhibición de 38,1 y 14,8% respectivamente, sólo el grupo V presentó diferencia estadística significativa.

Los niveles de actividad péptica total de los grupos V y VI, presentó una baja concentración con respecto al grupo II y presentando una inhibición del 30,5 y 9,5%, siendo estadísticamente significativo en el grupo V con dosis de 5 ml/ kg de peso ($p < 0,05$).

Tabla 5 Niveles de Acidez y actividad péptica total

Grupos	Acidez total		Actividad Péptica total	
	eq-g/[H ⁺]	% inhibición	mg/ 4h	% inhibición
Grupo I	0,84 ± 0,2		27,1 ± 10,5	
Grupo II	1,2 ± 0,4		28,5 ± 3,9	
Grupo III	0,3 ± 0,1	74,1	22,1 ± 11,1	22,6
Grupo IV	1,34 ± 0,3	-17,3	30,7 ± 6,6	-7,4
Grupo V	0,7 ± 0,3 ^(a)	38,1	19,7 ± 3,8 ^(a)	30,9
Grupo VI	1,0 ± 0,2	14,8	25,8 ± 4,0	9,5

Grupo I (control negativo), Grupo II (control positivo), Grupo III (control estándar), Grupos IV – VI (zumo de espinaca 2, 5 y 10 ml/kg).

Shapiro Will $p > 0,05$ MEDIA ± DE

(a) $p < 0.05$ comparado con el grupo II

4.3. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA

Todos los cortes histológicos, presentaron una inflamación crónica profunda con presencia de linfocitos y células plasmáticas y con una densidad inflamatoria leve. En el grupo II, al que se le administró histamina, se observó que la localización de la inflamación fue superficial, intermedia y profunda y sin presencia de daño mucinoso.

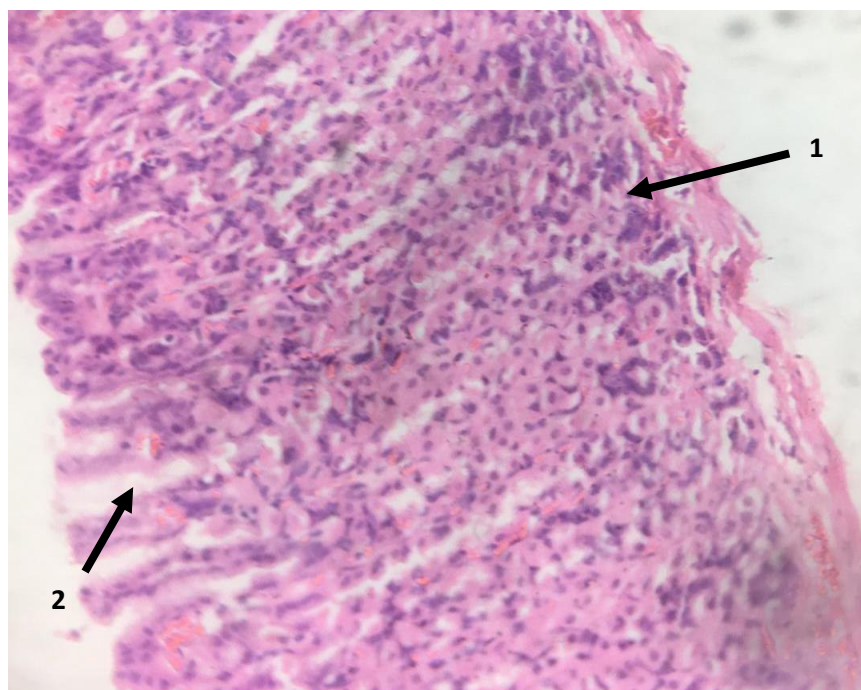


Figura 1 Microfotografía de tejido gástrico grupo I - control negativo

- (1) presencia de gastritis crónica leve inactiva profunda en la mucosa gástrica.
- (2) y sin daño mucinoso.

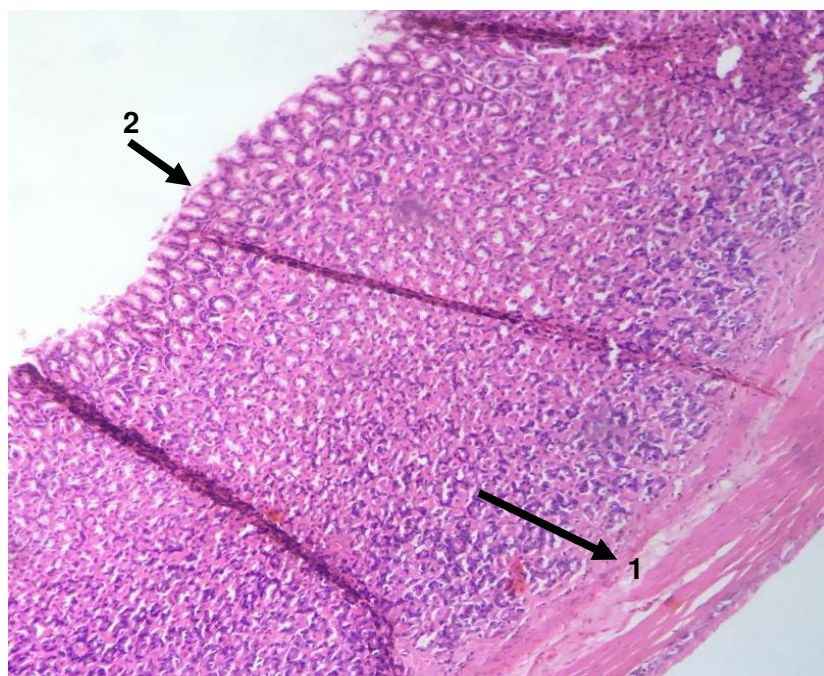


Figura 2 Microfotografía de tejido gástrico grupo II - control positivo

- (1) presencia de gastritis crónica leve inactiva profunda en la mucosa gástrica.
- (2) presencia de daño mucinoso leve.

En las láminas del grupo al que se le administró ranitidina e histamina (grupo III), no se evidenciaron cambios con respecto al grupo I, presentando una gastritis crónica leve profunda sin presencia de daño mucinoso.

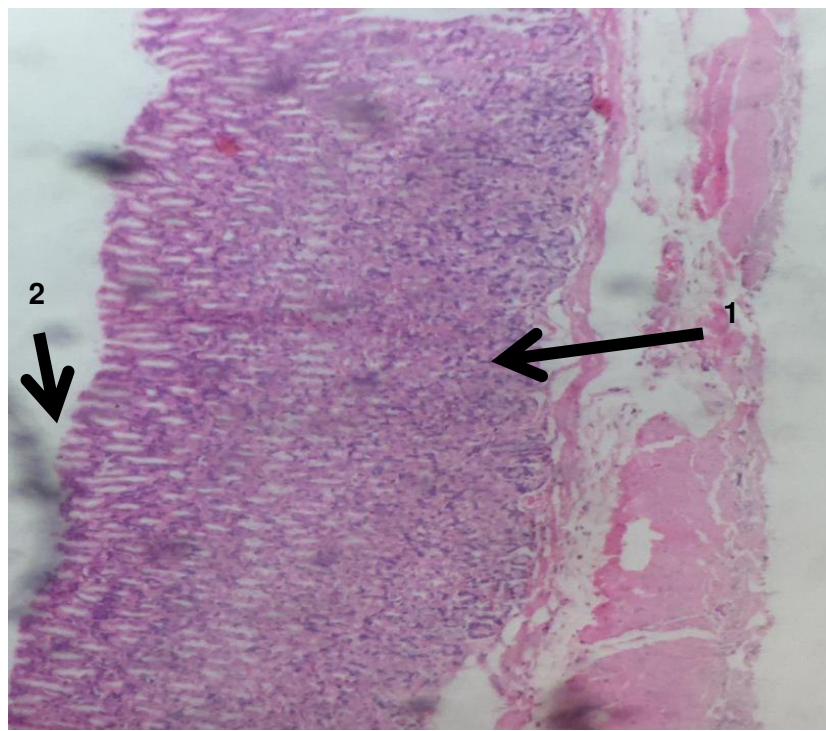


Figura 3 Microfotografía de tejido gástrico grupo III - administración con ranitidina

(1) Inflamación crónica leve profunda en mucosa gástrica.

(2) daño mucinoso ausente.

En el grupo experimental IV; al que se administró *Spinacia oleracea* "espinaca" a dosis de 2 ml/kg, se evidenció una gastritis crónica leve profunda inactiva con presencia de linfocitos. En algunas láminas se presencié un daño mucinoso leve.

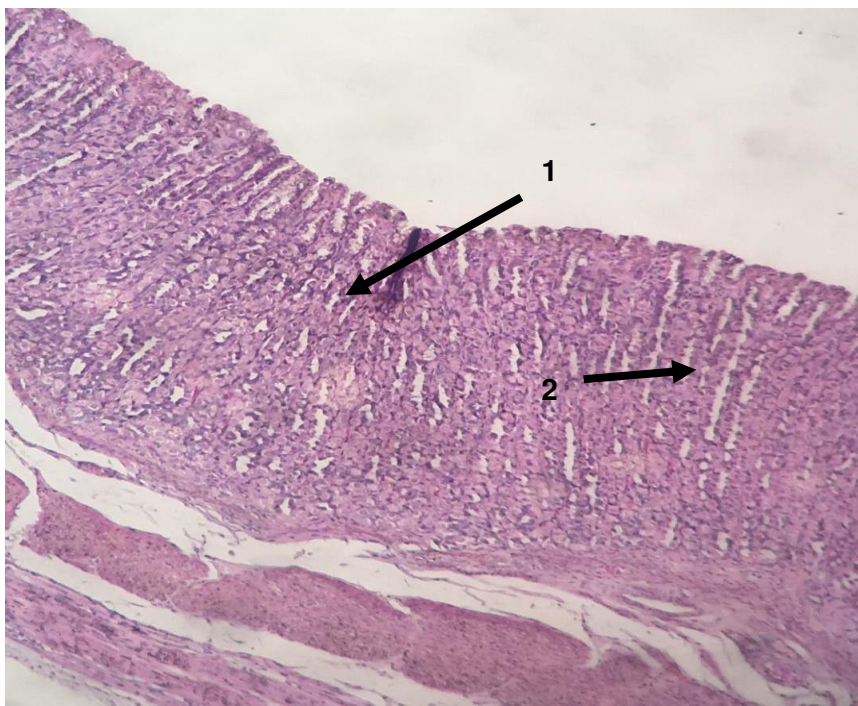


Figura 4 Microfotografía de tejido gástrico grupo IV – zumo de espinaca 2 ml/kg

(1) gastritis crónica aguda leve superficial en la mucosa gástrica.

(2) daño mucinoso leve.

En las láminas del grupo experimental V; al que se administró *Spinacia oleracea* “espinaca” a dosis de 5 ml/kg, se evidenció una gastritis crónica leve profunda inactiva con presencia de linfocitos. En algunas láminas se presencié un daño mucinoso leve.

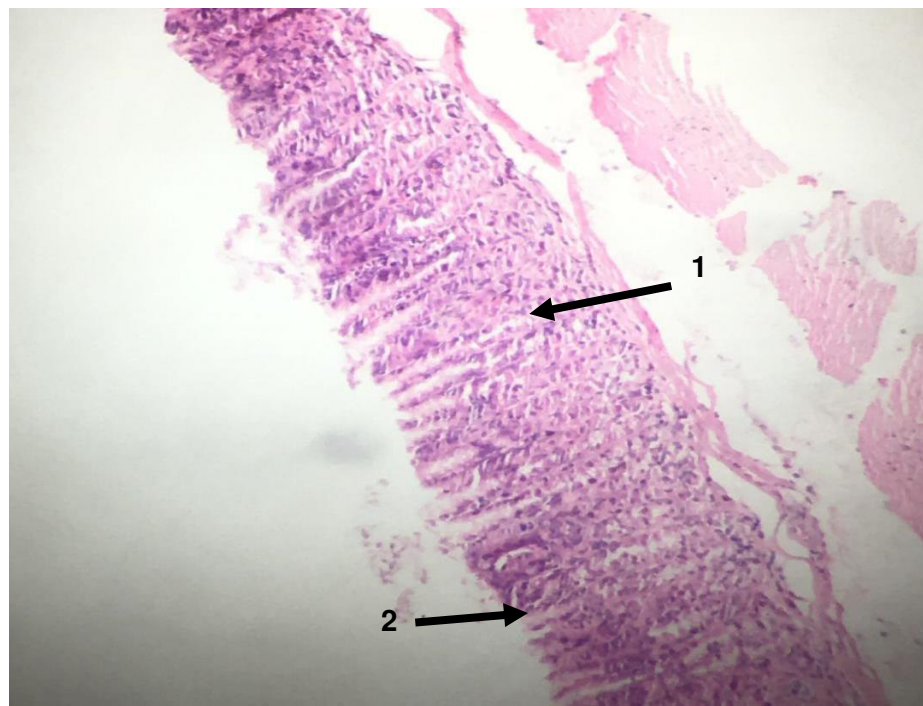


Figura 5 Microfotografía de tejido gástrico grupo V - zumo de espinaca 5 ml/kg

(1) gastritis crónica aguda leve profunda en la mucosa gástrica.

(2) daño mucinoso leve.

En las láminas del grupo experimental administrado con espinaca a dosis de 10 mL/kg se evidenció una gastritis crónica moderada y aguda leve superficial y profunda con daño mucinoso leve y con presencia de neutrófilos y linfocitos.

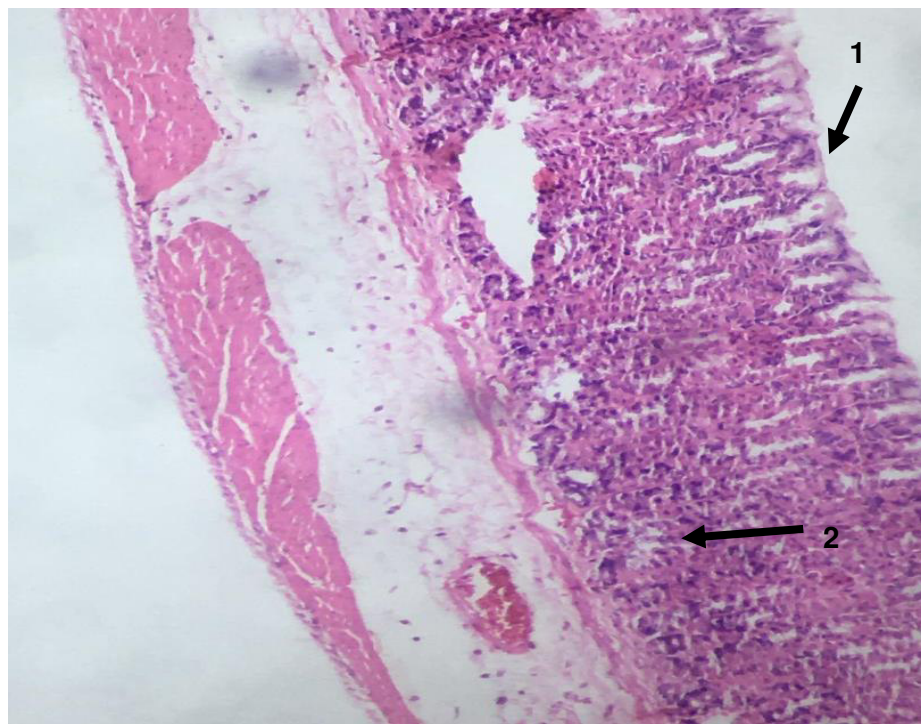


Figura 6 Microfotografía de tejido gástrico grupo VI - zumo de espinaca 10 ml/kg

(1) gastritis crónica moderada y aguda leve superficial

(2) daño mucinoso leve.

V. DISCUSIÓN

Las ciencias de la salud están en la búsqueda de nuevas alternativas naturales de consumo habitual que puedan servir en la prevención o como un coadyuvante al tratamiento de las diversas enfermedades; como es el caso de la espinaca. Diversas investigaciones mencionan que la espinaca puede presentar propiedades hipolipemiantes, hipoglucémicas, antiinflamatorios y anticancerígenas (40). En esta investigación, se ha propuesto que el zumo de *Spinacia oleracea* “espinaca” presenta efecto gastroprotector frente a la hipersecreción gástrica inducida por histamina en ratas.

En el grupo II se observó un bajo perfil del sistema GSH y de moco gástrico y un mayor nivel de lipoperoxidación. Respecto a la secreción gástrica, se observó un mayor volumen gástrico, acidez total y la actividad péptica, así mismo, un menor nivel del pH y presentaron un daño superficial y mucinoso leve.

La histamina que fue administrada en el grupo II, actúa directamente como un estimulador paracrino de la secreción del HCl, al unirse a los receptores H₂ de las células parietales, causando un incremento del AMPc dependiente de Calcio, el cual estimulan a las proteínas quinasas, para activar la bomba de protones, produciendo aún más la secreción ácida (19,47). De forma indirecta, también la histamina incrementa la secreción del HCl, al unirse a los receptores H₃ de las células D, e inhibe la secreción de la somatostatina (48). Esto podría explicar el mayor volumen de jugo gástrico, eq-H⁺ y un menor nivel de pH.

La secreción continua de jugo gástrico, puede conllevar a un proceso inflamatorio y ulceroso en el tracto gastrointestinal, debido a que se genera una filtración de los iones H⁺ por un cambio de los iones Na⁺ celular, disminuyendo el pH intracelular, causando un proceso de injuria y posterior muerte celular (49–51). Esta hipersecreción también pudo ser producto del estrés que fueron sometidos al proceso quirúrgico de la ligadura pilórica (26). De acuerdo con Brodie en 1966, hubo un incremento en los niveles de volumen gástrico y ácido titulado,

incrementándose entre la primera y segunda hora posterior a la ligadura pilórica (52). Esto podría explicar la inflamación superficial leve observado en algunas muestras y los marcados de secreción gástricas de tejido del grupo II.

La técnica de ligadura pilórica induce a una filtración de neutrófilos, expresados en un incremento de la actividad de la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa (50). Esta última genera aniones superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) (53,54). Este radical libre, en pH fisiológico y se difunde en el tejido. Este radical, es metabolizado por la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) formando H_2O_2 (53). El H_2O_2 es reducido por la Glutación Peroxidasa (GPx), teniendo al GSH como sustrato donador de Hidrógeno y convirtiéndolo en Glutación oxidado (GSSG) (55). Cuando se presenta una formación exagerada del GSSG, la célula libera el exceso de ella para que pueda degradarse extracelularmente, aumentando el requerimiento celular para la síntesis *de novo* de GSH (56).

El aumento de radicales libres puede alterar las moléculas de las células, siendo más vulnerables las proteínas, el ADN nuclear y mitocondrial y la membrana lipídica. Estos lípidos peroxidados son metabolizados por la vía de la β -oxidación generando como productos principales al malondialdehído (MDA) y el 4-Hidroxiénanal (4-HNE) (55). Para la eliminación del 4-HNE, la glutatión-S-transferasa puede conjugar al GSH y formar el glutatión-4-Hidroxiénanal (GSHNE), este producto es transportado por las proteínas transportadoras de unión a ATP (ABC) y no transportadoras ABC (57). Todo podría estar asociado a una disminución del perfil GSH del grupo II.

El nivel de GSH del grupo II, puede estar relacionado a la técnica de ligadura pilórica, en estudios publicados se ha observado que los niveles de GSH fueron cada vez menores a medida que transcurre las horas, y que los niveles de lipoperoxidación fueron incrementándose (50). Estos resultados también han sido reportados por Tanaka y Yuda en 1993, que mediante un proceso de isquemia/reperfusión y ligadura pilórica, evidenció un aumento de los niveles de TBAR's (58). A todo esto, los niveles de lipoperoxidación y GSH podría estar relacionados a la hipersecreción sumado al efecto de la técnica por ligadura pilórica.

El bajo nivel de moco gástrico en el grupo II puede estar relacionado a la acumulación del jugo gástrico, esto implica la retención del HCl y las enzimas proteolíticas (pepsina), sustancias agresoras a la mucosa gástrica (59) Takeuchi y Okabe reportaron que en la técnica de inmersión en agua y ligadura pilórica hubo un incremento de la actividad péptica en relación al tiempo, así como un incremento inicial de la concentración de protones en las primeras 3 horas (60). esta situación, también genera un proceso inflamatorio, el cual está medido por la actividad de la COX-2 (55) (61), por lo que podría explicar el incremento de los niveles de la actividad péptica y su relación con la disminución del moco gástrico en el grupo II.

En el 2013, Monteiro et al., indicaron que la estimulación por histamina a cantidades de 3 mg/kg, incrementa del volumen gástrico, la concentración de protones, y disminuye del pH, comparado con el control, estos resultados presentan la mism

a tendencia con nuestra investigación (25); sin embargo, en otro estudio realizado por Sandoval et al, en el 2008, no se presentaron variaciones en los niveles de pH, volumen gástrico y actividad péptica (62).

En el grupo III (ranitidina + histamina), se observó un mayor del perfil del sistema GSH y moco gástrico y una menor lipoperoxidación. Respecto a la secreción gástrica, se observó un menor volumen gástrico, acidez total y la actividad péptica, así mismo un aumento del pH. Mientras que la evaluación histológica no presenta diferencia con el grupo control negativo.

Aquellos resultados pueden deberse a que la ranitidina es un bloqueador de los receptores H₂ que inhibe de forma competitiva con la histamina, en la membrana basolateral de las células parietales, inhibiendo la secreción de ácido gástrico, pepsina e incrementando el pH gástrico, sin alterar la secreción de la mucosa gástrica (63,64). A su vez, diversas investigaciones *in vitro*, han reportado la capacidad antioxidante de los bloqueadores de receptores H₂ frente a las especies reactivas generadas por los neutrófilos (65) (66).

Así como, Ching et al en 1994, evaluó la capacidad antioxidante de la ranitidina, entre otros bloqueadores H₂, frente a los radicales de ácido hipocloroso (HClO), especie reactiva generada por la enzima mieloperoxidasa del neutrófilo. Esta

capacidad antioxidante puede deberse al papel que juega el azufre en la captación de estos radicales (66). En otro estudio se ha reportado la actividad de la captación de OH^\bullet , HClO y NH_4Cl por parte de los bloqueadores de receptores H_2 (67), por lo que en parte puede explicar la preservación de los niveles de glutatión y la disminución de los niveles de lipoperoxidación en el grupo III.

Por otro lado, la ranitidina puede inhibir la elastasa de los neutrófilos, y de esta manera disminuir la filtración esta célula en el endotelio, previniendo el desarrollo de la injuria en la mucosa gástrica (68). Mientras que Mikawa et al en 1999, observó que la ranitidina no influye sobre las funciones de quimiotaxia ni fagocitaria de los neutrófilos, a diferencia de la cimetidina y la famotidina (69). Esto explicaría una mejor conservación del tejido gástrico del grupo III.

Empleando la misma técnica de ligadura pilórica e histamina, los estudios de Gyawali en 2013, Sandoval en 2008 y Juvekar et al en 2012 evidenciaron que la administración de ranitidina a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg de peso respectivamente, un incremento del pH, disminución de la actividad péptica y de la acidez total (62,70,71). Así mismo, se evidenció por un incremento del pH y sin cambios en el volumen gástrico en niños con cirugía electiva y con administración de ranitidina (72).

En los grupos que se le administró el extracto de hojas de *Spinacia oleracea* "espinaca", los resultados del perfil GSH, moco y pH fueron mayores; además, se presentó menores niveles de lipoperoxidación, volumen gástrico, acidez total y actividad péptica. A nivel histológico en el grupo V no se evidenció diferencia control respecto al grupo I, mientras que en el grupo IV y VI se presentó un daño superficial y mucinoso leve.

Los estudios fitoquímicos de las partes de la planta (hojas y semillas) de la *Spinacia oleracea* "espinaca" reportan la presencia de polifenoles, flavonoides (patuletina y espinacentina y sus derivados que la presentan grupo 3',4'-dihydroxyl, grupo que permite captar más radicales), carotenos (β -caroteno y luteína), minerales (cobre, zinc y manganeso), quercetina, ácido p-cumárico, así como compuestos extraídos de sus tilacoides. Estos compuestos presentan la capacidad de captar radicales libre (32,40,73–76).

La preservación de los niveles GSH en los grupos que recibieron histamina y espinaca puede deberse a que algunos compuestos, como los carotenoides, que además de su capacidad antioxidante, pueden influir en el sistema antioxidante celular. Los trabajos de Sindhu en el 2012 y Mara et al. en el 2014 reportaron que la administración de luteína puede estar relacionado a un incremento en la expresión de genes de enzimas antioxidantes como la Glutación Peroxidasa 2 (GPx-2), que está presente en mayor cantidad en el sistema gastrointestinal y encargada de captar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y también expresión del NADPH deshidrogenasa (77,78).

Así como, la preservación del perfil GSH de los grupos IV -VI, puede deberse a la capacidad antioxidante de los compuestos de la espinaca. Bhatia y Jain en 2004 investigaron el efecto protector de la *Spinacia olearecea* frente a la irradiación en tejido hepático, se evidenció una inhibición de la lipoperoxidación, así como la preservación de los niveles de GSH. Se le atribuye dicho efecto, debido a la presencia de ácido ascórbico, β -catorceno, zeaxantina y luteína que actúan inhibiendo la autooxidación de los lípidos de la célula. La presencia de cobre, zinc y manganeso también ayudan en la inhibición de la lipoperoxidación, manteniendo los niveles de Cu Zn SOD y Mn/Fe SOD (32).

El NF- κ B está involucrado en la activación de la transcripción de citoquinas inflamatorias (IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α) (79). El β -caroteno y luteína presentes en la espinaca, pueden prevenir procesos inflamatorios en el epitelio gástrico, al inhibir la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la interleuquina-8 (IL-8) (80). Mientras que en un estudio *in vitro*, la luteína extraída de la espinaca refiere una inhibición en un 50% en la interleuquina-1 β (IL-1 β) e interleuquina-6 (IL-6) en macrófagos (74). Así como Ishii en el 2017 reportó que los glicolípidos extraídos de la espinaca bloquean la adhesión de los monocitos e inhiben la fosforilación de NF- κ B, así como un incremento de la producción de NO en células endoteliales (81).

Los antioxidantes hidrosolubles de la espinaca pueden presentar un efecto inhibitorio sobre el marcadores de inflamación (inducción de NO sintasa (iNOS), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y una captación de las especies reactivas como el

NO• y endoperoxidos (82). Por lo expresado, puede deberse a la preservación del tejido en algunas muestras de los grupos.

Se ha reportado un efecto protector de los glicoglicerolípidos extraídos de la espinaca sobre el daño de la mucosa intestinal inducido por el 5-fluorouracil, dicho efecto puede deberse a la presencia de mono y di -galactocil-diacilglicerol (MGDG y DGDG), los cuales presentan un efecto antioxidante así como un incremento de la viscosidad e hidrofobicidad de la mucosa intestinal (83).

La capacidad antioxidante del extracto acuoso de la espinaca ha sido demostrado por Vasant (2012) y Farjah (2018) por medio de los niveles de malondialdehído sérico, los cuales están relacionados a sus compuestos, entre ellos el ácido lipóico (84) (85).

La espinaca además, presenta quercetina en bajas concentraciones (40). Se ha demostrado que la quercetina puede prevenir lesiones que fueron inducidos por estrés y por ligadura pilórica, presentando una menor concentración de histamina, también se ha demostrado que la quercetina inhibe la actividad lipoxigenasa e incrementa la actividad de la cicloxigenasa (86).

El volumen de jugo gástrico, la acidez total y la actividad péptica de los grupos administrados con extracto de hojas de *Spinacia oleracea* fueron similares a los trabajos realizados por Vandana et al. en el 2016, quien reportó que el jugo de espinaca podía neutralizar el ácido secretado en un modelo artificial de estómago, atribuyéndole este efecto por la presencia de minerales alcalinos (manganeso, magnesio, potasio, calcio, folatos) (30). Mientras que Kore et al, en el 2011 reportó que el extracto acuoso de la *Spinacia oleracea* presentó una mayor protección a dosis de 1000 mg/kg, lo cual podría mejorar el índice de ulceración por una menor acidez libre, acidez total y actividad de la pepsina en jugo gástrico (29).

Yadav et al, en 2018 observó que el extracto etanólico de las semillas de la espinaca presentó capacidad antioxidante de los constituyentes fitoquímicos de la semilla (flavonoides y polifenoles); así como, efecto protector ante un modelo de injuria neuronal, evidenciando un efecto antiinflamatorio, reduciendo los niveles de TNF- α y lipoperoxidación e incrementando el glutatión reducido (75).

VI. CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES

- ✓ La administración del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” incrementa el perfil del GSH, moco gástrico y disminuye la lipoperoxidación frente a la hipersecreción inducida por la histamina.
- ✓ La administración del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” a produce una disminución del volumen gástrico, actividad péptica y acidez total e incrementa el nivel de pH frente a la hipersecreción inducida por la histamina.
- ✓ La administración del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” no presenta evidencia suficiente de ejercer efecto gastroprotector a nivel histológico estudios histológicos.
- ✓ La administración del zumo de hojas de *Spinacia oleracea* “espinaca” ejerció un efector gastroprotector frente a la hipersecreción inducida por histamina en ratas.

6.2. RECOMENDACIONES

- ✓ Determinar la actividad enzimática del superóxido dismutasa y catalasa.
- ✓ Evaluar efecto regenerador del zumo de hojas de *Spinacia oleacea* “espinaca” sobre la mucosa gástrica.
- ✓ Determinar el contenido de polifenoles y flavonoides.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oficina General de Estadística e Informática de Ministerio de Salud. Casos de enfermedades del esófago; estómago y duodeno por etapas de vida; según departamento. 2014.
2. César J, Travieso F. Incidencia actual de la gastritis : una breve revisión. Rev CENIC Ciencias Biológicas. 2014;45(1):10–7.
3. Kemmerly T, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. 2013;29(6):642–9.
4. Montes Valles M. Helicobacter pylori y Nutrición: actividad patogénica. 2016;
5. White JR, Ingram RJM, Atherton JC. Gastritis, Peptic Ulceration and Related Conditions. Fourth Edi. Infectious Diseases. Elsevier Ltd; 2017. 321-327.e1 p.
6. Soto H, Constanzo A, Azamar A, Reyes J, Fernández C, Azamar A. Análisis coste-efectividad del triple esquema para erradicación de Helicobacter pylori como profilaxis al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico en México. PharmacoEconomics Spanish Res Artic. 2016;13(1):9–15.
7. Arroyo M, Alcedo J, Lanas A. Gastropatía por antiinflamatorios no esteroideos. Medicine (Baltimore). 2004;9(2):75–83.
8. Sam Harirforoosh, Waheed Asghar and FJ. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of. J Pharm Pharm Sci. 2013;16(5):821–47.
9. Avenda M, Javier H, Ram J. Inhibidores de la secreción ácida gástrica para profilaxis de úlceras por estrés, indicaciones apropiadas e inapropiadas y su impacto económico en un hospital de segundo nivel en Mexicali. Med Interna México. 2010;26(5):431–6.

10. Papis S. Análisis de la Relevancia Sanitaria y Económica en la Prescripción de Antiulcerosos del Grupo de los Prazoles. *Acta Farm Bonaer.* 2006;25(2):283–8.
11. de la Torre A, Kettenhofen W, Roesch F, Rodríguez L, Mejía A, Peniche J. Guía de diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico . *Epidemiología , factores historia natural. Rev Gastroenterol México.* 2010;2(75):237–9.
12. Rodríguez H, Jacobo J, Guerrero F. Factores de riesgo para la recurrencia de úlcera péptica. *Gac Med Mex.* 2001;137(4):303–10.
13. Okamoto C, Karvar S, Forte JG, Yao X. The Cell Biology of Gastric Acid Secretion. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2012. p. 1251–79.
14. Shulkes A, Baldwin GS, Giraud AS. Regulation of Gastric Acid Secretion. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2006. p. 1223–58.
15. Guyton Hall. *Tratado de fisiología médica.* 12th ed. 2012. 765–783 p.
16. Mahadevan V. Anatomy of the stomach. *Surgery.* 2014;32(11):571–4.
17. Amerongen HM. Anatomy and Histology of the Digestive Tract. In: *Reference Module in Biomedical Research.* Elsevier Inc.; 2015. p. 1–13.
18. Schubert M. Regulation of Gastric Acid Secretion. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* First Edit. Elsevier Inc.; 2012. p. 1281–310.
19. Rodríguez D, Alfaro A. Actualización de la Fisiología Gástrica. *Med Leg Costa Rica.* 2010;27(2):59–68.
20. Díaz L. Gastric mucosa : Protective mechanisms and harmful effects of acetylsalicylic acid. *Physiological and biochemical approaches. Med e Investig.* 2016;3(1):100–3.
21. Valdivia M. Gastritis y gastropatías. *Rev Gastroenterol del Perú.* 2011;8(2):62–8.
22. Sandoval M, Huamán O, Oré R, Loli A, Ayala S. Efecto antioxidante y citoprotector del *Solanum tuberosum* (papa) en la mucosa gástrica de animales de experimentación. *An Fac med.* 2010;71(3):147–52.

23. Lanas Á, Fernández Á, Sáinz R. Trastornos relacionados con la secreción gástrica ácida. In: Gastroenterología y Hepatología. 2011. p. 271–80.
24. Valenzuela E. J. Helicobacter pylori: 20 años después. Rev Med Chil. 2004;132(11):1339–44.
25. Monteiro K, Spindola H, Possenti A, Tinti S, Ruiz A, Longato G, et al. Characterization of a refinement of the "pylorus ligation" model of rat gastric ulceration resulting in "no pain" and a more specific pharmacological response. J Pharmacol Toxicol Methods. 2013;67(2):121–8.
26. Dai S, Ogle C. Gastric ulcers induced by acid accumulation and by stress in pylorus-occluded rats. Eur J Pharmacol. 1974;26:15–21.
27. Sanvodal M, Ayala S, Oré R, Loli R, Huamán O. Estimulación de la actividad péptica del jugo gástrico, inducida por látex de Croton palanostigma (sangre de grado). An la Fac Med. 2008;69(3).
28. Delgado R, Flores D, Villalobos E. Effect of Capsicum annum L (pucunucho, ají mono) in gastric ulcer experimentally induced in rats. Rev Gastroenterol del Perú. 2015;35(2):141–6.
29. Kore J, Shete V, Patel J, Kulkarni B. Antiulcer Activity of Aqueous Extract of Spinacia oleracea in rats. Int J Res Pharm Chem. 2011;1(3):654–61.
30. Vandana P, Priyanka S. A comparative study of the antacid effect of raw spinach juice and spinach extract in an artificial stomach model. J Complement Integr Med. 2016;13(4):1–5.
31. Rahati S, Eshraghian M, Pishva H. Effect of spinach aqueous extract on wound healing in experimental model diabetic rats with streptozotocin. J Sci Food Agric. 2015;96(7):2337–43.
32. Bhatia A, Jain M. Spinacia oleracea L. protects against gamma radiations: a study on glutathione and lipid peroxidation in mouse liver. Phytomedicine. 2004;11(7–8):607–15.
33. Hoyos V, Rodríguez M. Análisis del crecimiento de espinaca (Spinacia oleracea L.) bajo el efecto de diferentes fuentes y dosis de nitrógeno. Resvista Colomb Ciencias Hortícolas. 2009;3(2):175–87.

34. Sensoy S, Turkmen O, Gorgun Y. Determination of Suitable Sowing Dates for Spinach Production in Van Ecological Condition. *Yuz Yil Univ J Agric Sci.* 2011;21:140–5.
35. Arias L, Espinosa L, Fuentes L, Gil R. El cultivo de la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y su manejo fitosanitario en Colombia. 2010th ed. 2010.
36. Instituto Nacional de Estadística e Informática I. Agrario. In: *Compendio de Estadística Perú 2014.* 2014. p. 939–1021.
37. Rao G, Rao P, Sulochanamma G, Satyanarayana A. Physico-chemical Amino acid composition, fatty acid profile , functional and antioxidant properties of *Spinacia oleracea* L . leaf. 2015;3(201 5):27–35.
38. Sultana B, Anwar F. Food Chemistry fruits , vegetables and medicinal plants. 2008;108:879–84.
39. Shivaranjani V, Poornima H, Umamaheswari J, Devi K. Preliminary phytochemical screening and quantification of bioactive compounds in the leaves of spinach (*Spinaceae oleraceae* L .). 2014;8(8):1113–9.
40. Roberts JL, Moreau R. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct.* 2016;
41. Argimon J, Villa J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 4th ed. 2013. 33–49 p.
42. Real Academia Española. Diccionario de la lengua española. 2018.
43. Lindsay, Sedlak J, H. R. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem.* 1968;25:192–205.
44. Buege J, Aust S. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 1975;129:302–10.
45. Guzmán X, Ramírez P, López S. Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. 2009;22.

46. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch ' s 3Rs Then and Now : The Need for Clarity in Definition and Purpose. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2015;54(2):120–32.
47. Norman A, Henry H. Gastrointestinal Hormones. In: Hormones. 2015. p. 141–69.
48. Schubert M, Peura D. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. Gastroenterology. 2008;134(7):1842–60.
49. Arredondo A, Amores J, Reyes R. La hipersecreción ácida en la práctica médica: un reto al médico práctico. Arch Médico Camaguey. 2009;13(4).
50. Rastogi L, Patnaik GK, Dikshit M. Free radicals and antioxidant status following pylorus ligation induced gastric mucosal injury in rats. Pharmacol Res. 1998;38(2):125–32.
51. Smith M, Morton Dion. The stomach: control. In: The Digestive System. 2010. p. 51–69.
52. Brodie D. The Mechanism of Gastric Hyperacidity Produced by Pylorus Ligation in the Rat. New Ser. 1966;2(3):231–41.
53. Miranda J, Bañares R, Vaquero J. The Gastrointestinal System: Anatomy and Sources of Oxidative Stress. In: Gracia Sancho J, Salvadó J, editors. Gastrointestinal Tissue. 1st ed. Academic Press; 2017. p. 3–20.
54. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe S. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. Physiol Rev [Internet]. 2014;94(2):329–54. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00040.2012>
55. Kwiecien S, Jasnos K, Magierowski M, Sliwowski Z, Pajdo R, Brzozowski B, et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury. J Physiol Pharmacol [Internet]. 2014;65(5):613–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25371520>

56. Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577–86.
57. Warnke M, Wanigasekara E, Singhal S, Singhal J, Awasthi S, Armstrong D. The determination of glutathione-4-hydroxynonenal (GSHNE), E-4-hydroxynonenal (HNE), and E-1-hydroxynon-2-en-4-one (HNO) in mouse liver tissue by LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2008;392(7–8):1325–33.
58. Tanaka J, Yuda Y. Role of Lipid Peroxidation in Gastric Mucosal Lesions Induced by Ischemia-Reperfusion in the Pylorus-Ligated Rs. *Biol Pharm Bull*. 1993;29–32.
59. Zhang SL, Li H, He X, Zhang RQ, Sun YH, Zhang CF, et al. Alkaloids from *Mahonia bealei* posses anti-H⁺/K⁺-ATPase and anti-gastrin effects on pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats. *Phytomedicine* [Internet]. 2014;21(11):1356–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.07.007>
60. Takeuchi K, Okabe S. Importance of Pepsin and Stomach Distension in Morphological Alterations of Stress-Induced Gastric Lesions in Pylorus-Ligated Rats. *Dig Diseases Sci*. 1988;33(1):52–9.
61. Sáenz J, Mills J. Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2018; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2018.5>
62. Sandoval M, Ayala S, Oré R. Estimulación de la actividad péptica del jugo gástrico, inducida por látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado). *An la Fac Med*. 2008;69(3):164–7.
63. Oates J, Wood A. HISTAMINE 2-RECEPTOR ANTAGONISTS. *N Engl J Med*. 1990;1672–80.
64. Helman C, Tim L. Pharmacology and clinical efficacy of ranitidine, a new H₂-receptor Antagonist. *Pharmacotherapy*. 1983;3(4):185–92.

65. Ahmadi A, Ebrahimzadeh M, Ahmad-Ashrafi S, Karami M, Mahdavi M, Saravi S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂receptor antagonists. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011;25(1):72–9.
66. Ching T, de Jong J, Bast A. Structural characteristics of histamine. *Eur J Pharmacol*. 1994;268:89–93.
67. Lapenna D, De Gioia S, Mezzetti A, Grossi L, Festi D, Marzio L, et al. H₂-receptor antagonists are scavengers of oxygen radicals. *Eur J Clin Invest*. 1994;24(7):476–81.
68. Okajima K, Murakami K, Liu W, Uchiba M. Inhibition of neutrophil activation by ranitidine contributes to prevent stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Crit Care Med*. 2000;28(8):2858–65.
69. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, et al. The effects of cimetidine, ranitidine, and famotidine on human neutrophil functions. *Anesth Analg*. 1999;89(1):218–24.
70. Gyawali S. Evaluation of Anti-Secretory and Anti- Ulcerogenic Activities of Avipattikar Churna on The Peptic Ulcers in Experimental Rats. *J Clin Diagnostic Res* [Internet]. 2013; Available from: http://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973-709x&year=2013&month=June&volume=7&issue=6&page=1135-1139&id=3058
71. Juvekar A, Sakat S, Tupe P. Gastroprotective effect of Oxalis corniculata (whole plant) on experimentally induced gastric ulceration in Wistar rats. *Indian J Pharm Sci* [Internet]. 2012;74(1):48. Available from: <http://www.ijpsonline.com/text.asp?2012/74/1/48/102543>
72. Christensen S, Lerman J. EFFECTS OF RANITIDINE AND METOCLOPRAMIDE ON GASTRIC FLUID pH AND VOLUME IN CHILDREN. *Br J Anaesth* [Internet]. 1990;65(4):456–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/bja/65.4.456>
73. Cho MJ, Howard L, Prior R, Morelock T. Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid

chromatography / mass spectrometry. J Sci Food Agric. 2008;1106(December 2007):1099–106.

74. Jaime L, Vázquez E, Fornari T, García-risco MR. Extraction of functional ingredients from spinach (*Spinacia oleracea* L .) using liquid solvent and supercritical CO 2 extraction. 2014;(June).

75. Yadav M, Parle M, Sharma N, Kumar D, Bhidhasra A. Protective effects of *Spinacia oleracea* seeds extract in an experimental model of schizophrenia: Possible behavior , biochemical , neurochemical and cellular alterations. Biomed Pharmacother [Internet]. 2018;105(June):1015–25. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.043>

76. Bergman M, Perelman A, Dubinsky Z, Grossman S. Scavenging of reactive oxygen species by a novel glucurinated flavonoid antioxidant isolated and purified from spinach. 2003;62:753–62.

77. Mara J, Mara I, Cólus DS, Singaretti F, Oliveira D, Ferro A, et al. Diet carotenoid lutein modulates the expression of genes related to oxygen transporters and decreases DNA damage and oxidative stress in mice. FOOD Chem Toxicol [Internet]. 2014;(June). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.05.018>

78. Sindhu ER, Kuttan R. Carotenoid lutein protects rats from gastric ulcer induced by ethanol. 2012;23(1):33–7.

79. Lawrence T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(6):1–10.

80. Kim Y, Seo JH, Kim H. β -Carotene and Lutein Inhibit Hydrogen Peroxide-Induced Activation of NF- κ B and IL-8 Expression in Gastric Epithelial AGS Cells. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2011;57(3):216–23.

81. Ishii M, Nakahara T, Araho D, Murakami J. Glycolipids from spinach suppress LPS-induced vascular inflammation through eNOS and NK- κ B signaling. Biomed Pharmacother [Internet]. 2017;91:111–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.052>

82. Lomnitski L, Foley JF, Grossman S, Shaul V Ben, Maronpot RR, Moomaw CR, et al. Effects of Apocynin and Natural Antioxidant from Spinach on Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Induction in Lipopolysaccharide-Induced Hepatic Injury in Rat. 2000;18–25.
83. Shiota A, Hada T, Baba T, Sato M, Yamanaka-okumura H, Yamamoto H, et al. Protective effects of glycolipids extracted from spinach on 5-fluorouracil induced intestinal mucosal injury. 2010;57(10):314–20.
84. Vasant K, Priyanka O, Gaikwad S. Protective effect of aqueous extract of *Spinacia oleracea* leaves in experimental paradigms of inflammatory bowel disease. *Imflammopharmacology*. 2012;20(5):277–87.
85. Farjah G, Pour M, Hassan M, Ansari K, Karimipour M. Protective effect of aqueous spinach (*Spinacia oleracea* L.) extract on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. *Vet Res Forum*. 2018;9(2):187–91.
86. Martin M, Motilva V, Lastra C. Quercetin and Naringenin ; Effects on Ulcer Formation and Gastric Secretion in Rats. 1993;7:150–3.